

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-113171

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月6日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 35/14		A 6 1 K 35/14	Z
35/28	A C C	35/28	A C C
38/04		48/00	A D V

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-224611

(22) 出願日 平成9年(1997) 8月21日

(31) 優先権主張番号 特願平8-222511

(32) 優先日 平8(1996) 8月23日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72) 発明者 帯刀 益夫

宮城県仙台市青葉区八幡5丁目3番10号

402

(72) 発明者 矢内 信昭

宮城県仙台市宮城野区福室7丁目14番28号

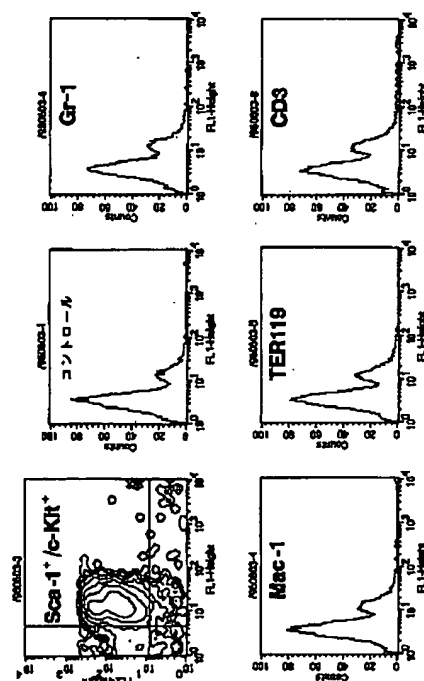
(54) 【発明の名称】 造血幹細胞様未分化細胞株

(57) 【要約】

【解決手段】 温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の骨髄間質細胞株との相互作用を選択手段として、造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株が得られる。

【効果】 造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株が得られた。得られた細胞株から、種々の因子や分化特異的抗原に対する抗体が得られる。

THS119の細胞表面抗原解析図



BEST AVAILABLE COPY

(2)

特開平10-113171

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の骨髄間質細胞株を用いることを特徴とする、造血幹細胞様未分化細胞株を得る方法。

【請求項2】 温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の不死化骨髄間質細胞株を用い、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄から不死化造血幹細胞様未分化細胞株の樹立方法。

【請求項3】 温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の骨髄間質細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化マーカーがLin<sup>-</sup>、Sca-1<sup>+</sup> およびc-Kit<sup>+</sup> である造血幹細胞様未分化細胞株を得る方法。

【請求項4】 温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の不死化骨髄間質細胞株を用い、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄から、細胞の分化マーカーがLin<sup>-</sup>、Sca-1<sup>+</sup> およびc-Kit<sup>+</sup> の不死化造血幹細胞様未分化細胞株の樹立方法。

【請求項5】 請求項1から4のいずれか1項に記載の温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物が、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入マウスである方法。

【請求項6】 温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入マウスの骨髄由来の骨髄間質細胞株TBR59との相互作用により選択することを特徴とする、造血幹細胞様未分化細胞株を得る方法。

【請求項7】 請求項1から6のいずれか1項に記載の方法で得られた造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株。

【請求項8】 細胞株THS119（受託番号：FERMBP-5613）

【請求項9】 請求項7または8に記載の造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株を用いることを特徴とする治療方法。

【請求項10】 請求項7または8に記載の造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株から得られる細胞自己再生因子。

【請求項11】 請求項7または8に記載の造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株から得られる分化誘導因子。

【請求項12】 請求項7または8に記載の造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株から得られる分化抑制因子。

【請求項13】 請求項7または8に記載の造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株の分化に特異的なマーカー抗原で作成される抗体。

【請求項14】 請求項13に記載の1つ以上の抗体か

らなる造血細胞分化段階の判定用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明の造血幹細胞様未分化細胞株、不死化造血幹細胞様未分化細胞株および温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの骨髄から樹立された造血幹細胞様の未分化の血液細胞株THS119などは、次のような産業上の利用分野がある。

【0002】これらの細胞株は、造血幹細胞の自己再生を司る因子、分化誘導因子および分化抑制因子の生産に利用できる。

【0003】また、造血幹細胞特異的マーカーの作成や、それに対する抗体の作成に有用である。得られた造血幹細胞特異的マーカーに対するマウスなどの抗体を基に、ヒトの抗体も通常の遺伝子操作技術で取得可能となる。この抗体は、骨髄移植等の際に、造血幹細胞の分離、同定、定量等に必要となる。

【0004】骨髄移植および遺伝子治療に、本発明の細胞株を利用できる。

【0005】更に、本細胞株は造血幹細胞の分化の研究に応用できる。血液細胞の分化の研究は進んでいるが、まだ未解決の部分もあり、本発明で得られた細胞株を用いて分子レベルでその分化の仕組みが理解できるようになり、引いては、各種機能を有する因子が得られる。これらの因子は、医薬品としての利用も考えられる。

【0006】その他、本細胞株自身の生産する新しいサイトカインの生産およびそのクローニング等にも用いることができ、また、様々な物質の薬理試験、毒性試験等にも使用できる。

## 【0007】

【従来の技術】造血幹細胞は1個の細胞から赤血球、白血球、巨核球、血小板、TおよびBリンパ球などあらゆる成熟血液細胞を作り出す能力、即ち多分化能を有すると同時に、自己再生能を持つ細胞である。分化の進んだ細胞の多くは分裂回数に限りがあるため、造血系を枯渇することなく維持させるために、この幹細胞は自分自身を複製する能力を持っている。自分自身を複製するには、何か因子が存在すると考えられているが、現在まだ見いだされていない。

【0008】この因子の発見も含めて造血幹細胞に関する情報は少なく、株化の報告も今までに無い。

【0009】株化されることがなかった故、造血幹細胞はその存在が知られているにもかかわらずその本態は不明のままとなっていた。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、造血幹細胞の株化の方法や造血幹細胞の機能を維持させたまま株化した不死化造血幹細胞様分化細胞株などを提供し、更に細胞株が得られたことにより以下に述べるものをも提供

(3)

特開平10-113171

する。

【0011】本発明は、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の骨髄間質細胞株を用いることを特徴とする、造血幹細胞様未分化細胞株を得る方法に関する。

【0012】更に、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の不死化骨髄間質細胞株を用い、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄から不死化造血幹細胞様未分化細胞株の樹立方法に関する。

【0013】また、本発明は、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の骨髄間質細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化マーカーがLin<sup>-</sup>、Sca-1<sup>+</sup>およびc-Kit<sup>+</sup>の造血幹細胞様未分化細胞株を得る方法に関する。

【0014】更に、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄由来の不死化骨髄間質細胞株を用い、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄から、細胞の分化マーカーがLin<sup>-</sup>、Sca-1<sup>+</sup>およびc-Kit<sup>+</sup>の不死化造血幹細胞様未分化細胞株の樹立方法に関する。

【0015】これらの方法は、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物が、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入マウスである方法が好ましい。

【0016】具体的には、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入マウスの骨髄由来の骨髄間質細胞株TBR59との相互作用により選択することを特徴とする、造血幹細胞様未分化細胞株を得る方法である。

【0017】上記の方法で得た造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株は、本発明の一態様では、細胞株THS119（受託番号：FERM BP-5613）である。

【0018】また、造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株を用いることを特徴とする治療方法に関する。

【0019】上記方法で得られた造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株からは、細胞自己再生因子、分化誘導因子および分化抑制因子などが得られる。

【0020】更に、造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株の分化に特異的なマーカー抗原で作成される抗体が得られ、これらより、1つ以上の抗体からなる造血細胞分化段階の判定用キットが組み立てられる。

【0021】

【課題を解決するための手段】本発明の造血幹細胞様未分化細胞株は、造血幹細胞の多分化能をほとんど保持したまま株化した未分化の細胞を意味する。造血幹細胞様未分化細胞株は、正常の組織からも得られ、更に種々の

変化や変異等によっても得られる。本発明の一態様でもある温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の骨髄から得る場合、その細胞株は不死化造血幹細胞様未分化細胞株となり安定に保持できる。

【0022】不死化細胞株の樹立方法は、特開平5-292958号公報などで行なえる。造血幹細胞様未分化細胞株を得るには、造血組織の間質細胞との相互作用を指標として選択すればよい。つまり造血幹細胞をはじめ、未分化な血球の増殖は造血組織の間質細胞に依存している。造血幹細胞や未分化な血球は間質細胞との共培養系で、間質細胞に潜り込むようにして敷石状のコロニーを形成することが知られている。本発明の実施例で詳述する方法では、様々な機能細胞株を樹立するのに有用であることが分かっている温度感受性突然変異のSV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの骨髄から、幹細胞を含む未分化な血球画分を取り出し、株化させた。

【0023】つまり、細胞の増殖を促すSV40Tラージ抗原遺伝子を導入したマウスの造血幹細胞を敷石状コロニー形成能を指標に間質細胞と共培養し、造血幹細胞または未分化血球の安定した培養系を作成し、細胞株を樹立した。

【0024】具体的には、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入マウスの骨髄より造血幹細胞を含むLin抗体（-）/Sca-1抗体（+）の細胞を取り出し、骨髄間質細胞株TBR59（受託番号：FERM BP-5612）と共培養した。この骨髄間質細胞層の下に潜り込んだ細胞を選択的に継代すると、3カ月程で間質細胞依存的に増殖する単一血球細胞集団となった。この細胞集団はLin抗体（-）/Sca-1抗体（+）のまま間質細胞層の下に潜り込んで増殖し、各血球の分化マーカーは陰性の細胞集団であった。

【0025】これは造血幹細胞の未分化細胞株であると考えられる。不死化造血幹細胞様未分化細胞株THS119は、工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託した。受託番号はFERM BP-5613である。

【0026】造血組織の間質細胞との相互作用を選択指標として、正常の組織からも造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株を得ることができる。

【0027】細胞株は、造血幹細胞の細胞表面の分化マーカーによりその性質が同定できる。この分化マーカーのうち、単球、B細胞、T細胞それぞれの分化抗原に対する抗体（Mac-1、Gr-1、B220、CD4、CD8など）に陰性の細胞を系統特異的抗原陰性という意味でLin<sup>-</sup>という。また、Sca-1抗体およびc-Kit抗体は幹細胞特異的抗原を認識するものである。

【0028】本発明の、造血幹細胞様未分化細胞株また

(4)

特開平10-113171

は不死化造血幹細胞様未分化細胞株を分化させるには、脾コロニー形成法 (Till J. E., McCulloch E. A., Rad. Res. 14, 213-222, 1961)、in vitroコロニー形成法 (三浦恭定、血液幹細胞、中外医学社、1983) および長期骨髓再構築 (Smith, L. G., Weissman, I. L., Heimfeld, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2788, 1991) などで行えばよい。分化させた後に、その分化マーカーを決め、分化段階 (ステージ) を判定すればよい。

【0029】得られた細胞株から、種々の因子を分離するには以下のようにすればよい。

【0030】休止期の状態にある細胞株に、ある種のコンディションド培地 (conditioned medium) を添加し、細胞が分裂を開始することがわかれば、その conditioned medium 中に自己再生を司る因子が含まれていることになる。常法に従いこの因子の精製を行い、更に遺伝子操作技術を用いれば、造血幹細胞の自己再生を司る因子が取得できる。同様のやり方で分化誘導因子や分化抑制因子の取得もできる。

【0031】また、これらの生物学的基礎となる機構に関与している因子は遺伝子レベルで保存されていると考えられる。つまり、マウスの種々の因子がヒトで機能する可能性も大いに考えられ、更に、マウスのものからそのホモロジーなどを利用して、ヒトの因子を取得することができる。ヒトの因子を用いることで、白血病、再生不良性貧血、骨髓移植等の臨床応用ができる。

【0032】更に、遺伝子レベルで保持されていることから、本発明のマウスの造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株を導入することにより、重症複合免疫不全症に代表される原発性免疫不全症候群の治療に用いることができる。導入する方法として

TER119抗体	1 mg/mlを、	2 $\mu$ l / $1 \times 10^6$	細胞
Gr-1抗体	0.04 mg/mlを、	2 $\mu$ l / $1 \times 10^6$	細胞
B220抗体	0.12 mg/mlを、	2 $\mu$ l / $1 \times 10^6$	細胞
Mac-1抗体	0.2 mg/mlを、	2 $\mu$ l / $1 \times 10^6$	細胞
CD4抗体	0.025 mg/mlを、	1 $\mu$ l / $1 \times 10^6$	細胞
CD8抗体	0.025 mg/mlを、	1 $\mu$ l / $1 \times 10^6$	細胞

および、

Sca-1抗体	0.4 mg/mlを、	10 $\mu$ l / $2 \times 10^5$	細胞
---------	-------------	------------------------------	----

温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入マウス大腿骨の骨髓から細胞を取り出し、10%血清を加えたERDF培地 (極東E-RDF培地、極東製薬工業製) で1~2時間37℃で培養し、接着性の細胞が基質に接着した時点で、浮遊している血球細胞を回収した。

【0039】血球細胞をリン酸緩衝生理食塩液 (ダルベッコPBS) で洗い、5mMエチレンジアミン四酢酸2ナトリウム (EDTA) と1%牛血清アルブミン (BSA) を含むPBS (Washing Buffer) に懸濁後、上述のLin抗体を加え、30分間氷上に保持した。細胞をWashing Buffer で2回洗った後、MACS (磁性体ビー

は、骨髓移植によってもよいし、正常な遺伝子を数多く、欠損遺伝子等を有する疾患細胞に導入するという遺伝子治療によってもよい。

【0033】以下に実施例を挙げ、具体的に本発明を説明する。

【0034】

【実施例】

【実施例1】骨髓間質細胞株

骨髓間質細胞株TBR59は、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの骨髓間質細胞から樹立された前脂肪細胞で、造血を長期間維持できる細胞株である。(Kameoka, J., Yanai, N., and Obinata, M., J Cell Physiol, 164, 55-64, 1995; Okuyama, R., Koguma, M., Yanai, N., and Obinata, M., Blood, 86, 2590, 1995; Okuyama, R., Yanai, N., and Obinata, M., Exp. Cell Res., 218, 424, 1995)。

【0035】細胞の維持は2%牛胎児血清、10  $\mu$ g/mlトランスフェリン、10  $\mu$ g/ml上皮増殖因子 (エビダーマルグロースファクター)、1  $\mu$ g/mlインスリンを加えたRITC80-7培地 (極東製薬工業製) を用い、33℃で培養を行った。

【0036】【実施例2】温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入マウス大腿骨からのLin抗体 (-) / Sca-1抗体 (+) 細胞の採取と培養  
大腿骨から得た骨髓のLin抗体 (-) / Sca-1抗体 (+) の細胞を未分化血球とした。

【0037】使用した各Lin抗体とその抗体濃度は以下の如くである。

【0038】

ズ結合抗ラットIgG; 10  $\mu$ l /  $1 \times 10^6$  cells) を加え、さらに30分間氷上に保持してからWashing Buffer で2回洗った。

【0040】マグネット (Miltenyi Biotec) でLin抗体 (+) 細胞をカラムでトラップし、Lin抗体 (-) 細胞を透過させ回収し、Washing Bufferで1回洗った後、Sca-1抗体を加え、30分間氷上に保持した。Washing Bufferで2回洗ってからさらに、MACSビーズを加え、30分間氷上に保持してからWashing Bufferで2回洗い、マグネットでSca-1抗体 (+) 細胞をカラムにトラップし、Sca-1抗体 (-) 細胞は透過

(5)

特開平10-113171

させて捨てた。

【0041】カラムにトラップしたSca-1抗体(+)細胞を回収し、飽和して単層になったTBR59と共培養した。培地は5%牛胎児血清と50μMのベータメルカプトエタノールを加えたERDF培地を用い、33℃で培養した。培地は2日ごとに交換し、10日ごとに継代した。

【0042】〔実施例3〕継代

Lin抗体(-)/Sca-1抗体(+)細胞はTBR59との共培養で、浮遊して増殖するもの、接着して増殖するものおよびTBR59細胞の下に潜り込んで増殖するものが出現するが、このうち潜り込んで増殖するものを選んだ。

【0043】共培養を0.1%コラゲナーゼ(和光純薬の細胞分散用)をDMEMに0.1%となるよう溶解したもので20分から30分処理し、培養全体を穏やかなピペティングによって細胞懸濁液とした。ナイロンメッシュを通した後、接着性の細胞であるTBR59と血球細胞を分離するために、5%牛胎児血清と50μMのベータメルカプトエタノールを加えたERDF培地を用い、37℃で1時間培養した。穏やかなピペティングを加え、血球細胞のみを新しい単層のTBR59と共培養した。

【0044】10日に一回の継代を行うと、4から5回目の継代から、TBR59細胞層全体にわたって潜り込んで増殖する細胞集団となり、7から8回目にはほぼ均一な細胞集団となり、以後、安定して継代できるようになる。10回目の継代時に、血球細胞の性状を調べ、この細胞をTHS119とした。

【0045】

【発明の効果】図1に示されるように、骨髓からLin抗体(-)/Sca-1抗体(+)細胞を取り出し、T

BR59と共培養した。この初代培養の特徴としては、写真に示すような潜り込んで増殖する細胞が培養できることで、潜り込んだ細胞だけを継代することによってのみ、未分化な血球集団とすることができた。

【0046】この未分化な血液集団は、図2に示されるように、ギムザ染色ではこの細胞は大小二種類の細胞からなることが分かる。小型の細胞は細胞質の割合が少なく、核の変形も少ないことから、未分化な血球の形態を示した。トルイジンブルーに染まる顆粒はない。大型の細胞はエステラーゼを持っていることが分かるので、分化した血球と考えられた。小型の細胞は、細胞の突起を染色しやすいアルカリ性フォスファターゼに染色されるものがあることから未分化な顆粒球細胞の性状を示していた。

【0047】図3に表面抗原の解析結果を示す。得られた細胞株THS119は血球の分化マーカー判定用として用いたGr-1抗体、Mac-1抗体、TER119抗体およびCD3抗体すべてに陰性であった。幹細胞の性状であるSca-1抗体およびc-Kit抗体は陽性であった。

【0048】よって、細胞株THS119は不死化造血幹細胞様未分化細胞株である。

【0049】本発明により、造血幹細胞様未分化細胞株または不死化造血幹細胞様未分化細胞株が提供できる。提供された細胞株より、細胞自己再生因子、分化誘導因子または分化抑制因子が得られる。また、分化に特異的なマーカー抗原も得られ、それより抗体も作成できる。

【図面の簡単な説明】

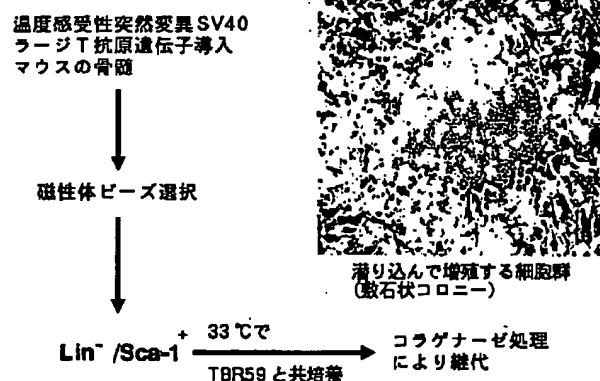
【図1】 培養系の説明の図である。

【図2】 THS119の染色像の図である。

【図3】 THS119の表面抗原の解析図である。

【図1】

### 造血幹細胞様未分化細胞株

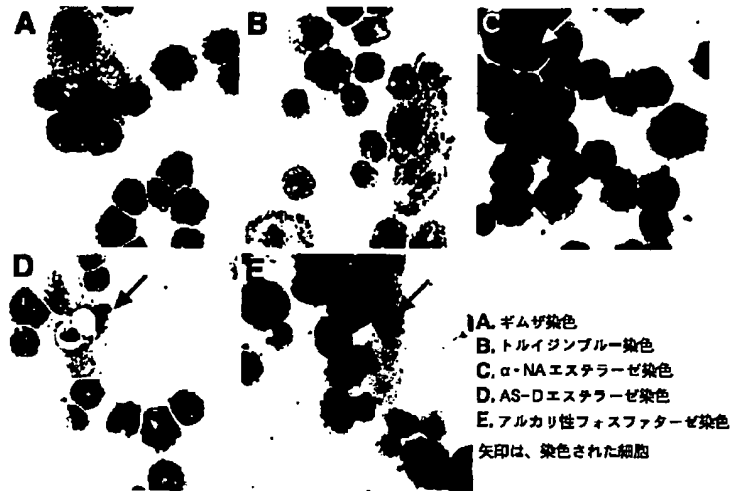


(6)

特開平10-113171

【図2】

## THS119 の染色像

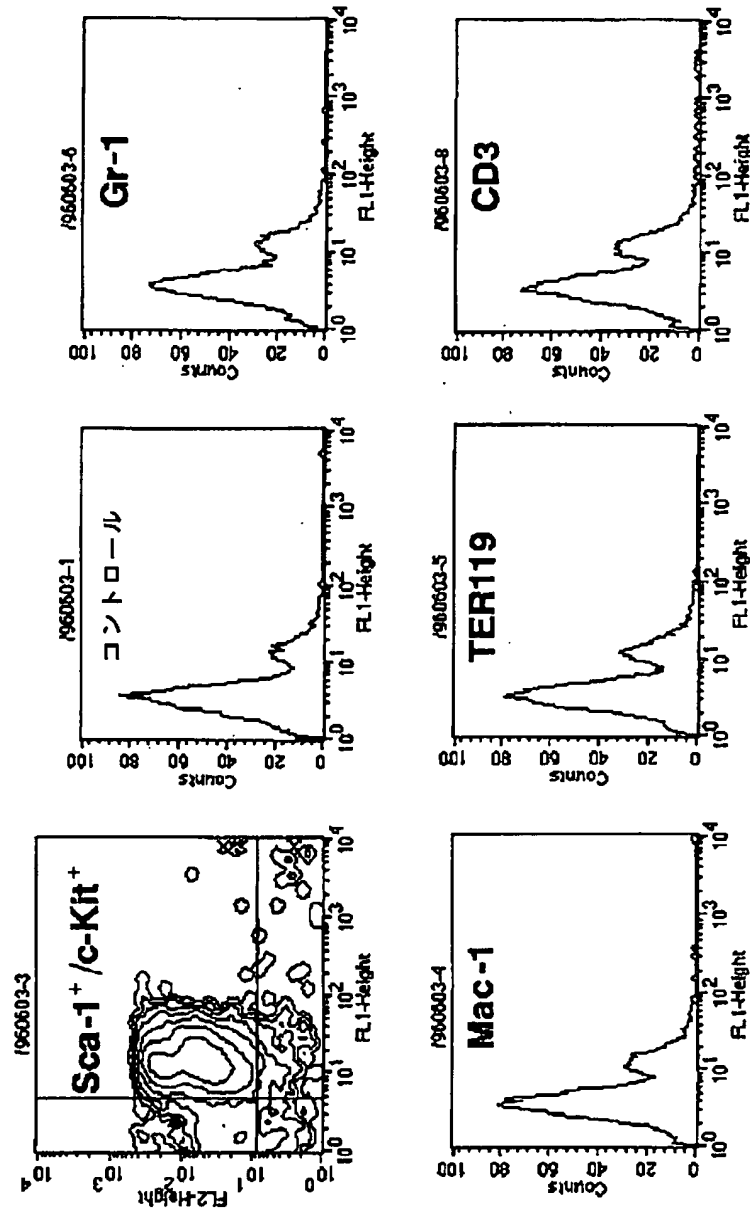


(7)

特開平10-113171

【図3】

## THS119の細胞表面抗原解析図



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

A61K 48/00

C07K 14/52

16/24

G01N 33/53

// C12N 15/09

(C12N 5/10

識別記号

ADV

FI

C07K 14/52

16/24

G01N 33/53

A61K 37/43

C12N 15/00

K

A

(8)

特開平10-113171

C12R 1:91)



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox**